

OBRAZAC 3

Naslov projekta	Središnji učinci botulinum toksina proizvedenog od Ipsena (Dysport) na bol u trigeminalnoj regiji i neurogeni upalu dura temporomandibularnog zgloba i trigeminalnog ganglija (<i>Central effects of botulinum toxin produced by Ipsen (Dysport) on pain in trigeminal region and temporomandibular joint, trigeminal ganglia, and dural neurogenic inflammation</i>)		
Trajanje projekta	1. lipnja – 30. rujna 2017.		
Ključne riječi (najviše do 5)	botulinum toksin, bol, upala, temporomandibularni zglob, štakor		
Svrha projekta (kao u članku 5. Pravilnika):	Temeljno istraživanje	da	ne
	Translacijska i primijenjena istraživanja	da	ne
	Korištenje određeno propisima i rutinska proizvodnja	da	ne
	Zaštita prirodnog okoliša u interesu zdravlja ili dobrobiti čovjeka ili životinje	da	ne
	Očuvanje vrste	da	ne
	Visoko obrazovanje ili osposobljavanje	da	ne
	Forenzička ispitivanja	da	ne
	Održavanje kolonije genetski izmijenjenih životinja koje se ne koriste u drugim postupcima	da	ne
Opišite ciljeve projekta (na primjer, znanstvene nepoznanice ili znanstvene ili kliničke potrebe).	Botulinum toksina tipa A (BT-A) je odobren za liječenje kronične migrene, a točan mehanizam kao i mjesto djelovanja nije u potpunosti razjašnjeno. U prijašnjim objavljenim pokusima na štakorima pokazali smo da bol uzrokovana različitim manipulacijama u području glave i vrata prati i upala moždanih ovojnica. U tim je modelima BT-A nakon lokalne primjene smanjio i bol i udaljeni neurogeni upalu moždanih ovojnica. U daljnjim pokusima istražiti ćemo detaljnije mehanizam djelovanja BT-A na razini kranijalne dura, trigeminalnog ganglija i samog zgloba. Specifični ciljevi ovog projekta su istražiti 1. utjecaj BT-A na mehaničku hiperalgeziju i taktilnu alodiniju u području glave i vrata nakon uzrokovanja upale temporomandibularnog zgloba u štakora; 2. aksonalni transport BT-A nakon periferne primjene u meningealnu živcu i strukture središnjeg živčanog sustava; 3. utjecaj na upalu u temporomandibularnom zglobu, trigeminalnom gangliju i duri štakora.		
Koje su potencijalne prednosti za koje je vjerojatno da proizlaze iz ovog projekta (kako znanost može biti unaprijeđena ili kako ljudi ili životinje mogu imati koristi od projekta)?	Razumijevanje mjesta i mehanizma djelovanja botulinum toksina na bol u području glave i vrata, što u konačnici može utjecati na širenje kliničkih indikacija BT-A.		
Koje vrste i približni broj životinja se očekuje da će se koristiti.	Wistar štakori, mužjaci stari 8-12 tjedana; 40 štakora		
U kontekstu onoga što se radi na životinjama, što su očekivani negativni učinci na životinjama: vjerojatna očekivana razina težine postupaka i sudbina životinja?	<i>Upalni model boli – posljedica pa životinje</i> Upala temporomandibularnog zgloba inducirana s unilateralnom injekcijom proupalne supstance kompletnog Freundovog Adjuvansa (CTA) uzrokuje starijem upalni odgovor i postupni razvitak upalne boli koja se razvija unutar 24 sata, a traje i do mjesec dana (Lackovic i sur. 2016; Villa i sur. 2010). Bol se očituje kao 50% tno sniženje mehaničkog praga podražaja na stimulaciju Von Frey evim filamentima (taktilna alodinija). Osim toga postoje promjene u uzorku hranjenja koje bi mogle biti pokazatelj evicirane boli kod procesa hranjenja (produljenje vremena i promjena intervala između hranjenja), bez učinka na težinu štakora (Kerins i sur. 2005).		

	<i>supstancu</i> Životinje će biti duboko anestetizirane kombinacijom anestetika ketamina i ksilazina, a onda će se sterilnom iglom injicirati testna supstanca (botulinum toksin tipa A i fiziološka otopina). Životinje će se anestetizirati ponovno nakon 3 dana i tada će se injicirati upalna supstanca (CFA). Budući da će životinje prilikom postupaka biti anestetizirane, ne bi trebale osjećati neposrednu neugodu prilikom postupaka injiciranja. Životinje se nakon toga oporave unutar 60 minuta i vraćaju u kaveze pod daljnjim nadzorom istraživača. <i>Postupci-bihevioralna mjerenje mehaničke alodinije</i> U toku trajanja pokusa životinje u eksperimentalnim grupama koje su podvrgnute upali temporomandibularnog zgloba osjetit će nelagodu/povećanu osjetljivost na dodirivanje orofacijalne regije pomeću Von Frey-ovih filamenata. Mjerenja će se u toku pokusa izvoditi 5 puta, od čega 2 puta prije izazivanja upale te 3 puta u vremenu trajanja upale. Svako mjerenje traje 60 minuta po pojedinoj životinji, a sastoji se od 3 ciklusa po pet minuta s pauzama od 15 minuta između ciklusa, tijekom kojih se životinje podvrgavaju taktilnom stimuliranju orofacijalne regije. Životinje će po završetku pokusa biti žrtvovane jer je potrebno uzeti uzorke tkiva za daljnje biokemijske i histološke analize. Pokus se klasificira kao umjeren.
Primjena načela 3R	
1. Zamjena Navedite zašto se moraju koristiti životinje te zašto se ne mogu koristiti alternativne metode koje ne uključuju životinje.	Istraživanje nocepcije i analgezije nije moguće provesti <i>in vitro</i> jer su u ovakvom tipu istraživanja prijedno potrebna bihevioralna mjerenja. U ovom se pokusu koristi u literaturi dobro opisani model uzrokovanja upalne boli temporomandibularnog zgloba u štakora koji omogućava praćenje povećane osjetljivosti na mehanički podražaj, kao i praćenje anatomskih, fizioloških i biokemijskih promjena na mjestu uzrokovanja boli, ali i na anatomski udaljenim mjestima, što se inače ne može pratiti kod ljudi ili na kulturnim stanicama. Upravo iz tog razloga istraživanja na glodavcima predstavljaju trenutno najprihvatljivije rješenje.
2. Smanjenje Objasnite kako može biti osigurano korištenje minimalnog broja životinja	U pokusima koristimo minimalan broj životinja potreban za dobivanje pouzdanih rezultata i zadovoljavanje statističkih kriterija. S obzirom na bihevioralna mjerenja i prethodna iskustva to je 10 životinja, od čega će se tkiva od po 5 životinja iz svake grupe nakon žrtvovanja koristiti za svaki od dva tipa planiranih analiza (to je minimalan broj životinja za kvalitativnu i kvantitativnu obradu rezultata biokemijskih i histoloških analiza).
3. Poboľšanje Objasnite izbor vrsta i zašto su korišteni životinjski modeli primjereniji od drugih, uzimajući u obzir znanstvene ciljeve. Objasnite opće mjere koje će se poduzeti kako bi se smanjile štete za životinje	Za sada ne postoje adekvatne alternativne metode za ispitivanje složenih mehanizama upalne boli i povezanosti lokalne upale s patološkim promjenama na udaljenim mjestima (strukturama središnjeg živčanog sustava). Životinjama u pokusu će se osigurati uvjeti mikrokolisa (dovoljno veliki kavez, čista stela) i makrokolisa (ciklus izmjene svjetla i tame 12/12 h, temperatura 23 °C, vlaga 50%) u skladu s relevantnim propisima i preporukama. Radi smanjenja stresa, životinje će se na svaki postupak i manipulaciju navikavati prije pokusa, a tijekom mjerenja će se izbjegavati čimbenici poput prejakog svjetla i buke koje u životinja mogu uzrokovati anksioznost i stres. Životinje će boraviti u kavezima u skupinama (3 štakora po kavezu), osim u razdoblju oporavka nakon iniciranja u zglob koji uključuje duboku anesteziju, kada će životinje biti izolirane u posebnim kavezima do potpunog buđenja iz anestezije. Hrana i voda će im biti ponudene <i>ad libitum</i> osim u vrijeme testiranja osjetljivosti (do 60 minuta u danu). U skladu sa smjernicama Internacionalne asocijacije za istraživanje

Slučajna dva pojma: *preživljavanje*
i *preživljavanje* i *sigurnost*

bol (ASP) tijekom bihevioralnog mjerenja se ne koriste analgetici za smanjenje boli jer mogu interferirati s učincima testirane supstance, u ovom slučaju botulinum toksina tipa A.

